

# Max-Planck-Gesellschaft

## Arbeitsgruppen für Strukturelle Molekularbiologie

**Leiter:** H.-D. Bartunik, E. Mandelkow (Sprecher), A. Yonath

**Die Max-Planck-Arbeitsgruppen beschäftigen sich mit den Beziehungen zwischen der Struktur und der Funktion von biologischen Makromolekülen. Thematische Schwerpunkte sind**

- die Enzyme und ihr katalytischer Mechanismus,
- das Zytoskelett und seine Rolle in Zellbewegung und Alzheimer-Krankheit,
- das Ribosom und seine Funktion in der Proteinbiosynthese.

**Die Proben werden mit biochemischen Methoden isoliert oder mit molekularbiologischen Methoden synthetisiert. Die wesentliche Methode der Strukturuntersuchung ist die Röntgenbeugung von Proteinkristallen, Fasern oder Lösungen; daneben werden weitere biophysikalische Analyseverfahren wie Spektroskopie, Elektronenmikroskopie, Bildverarbeitung und andere eingesetzt. Schwerpunkte methodischer und instrumenteller Entwicklungen sind neue Kristallisationsverfahren, Einsatz von elektronischen Detektoren, Laue-Methoden und eine Messstrecke für die Proteinkristallographie.**

## Forschungsschwerpunkte

### Proteindynamik

Die MPG-Arbeitsgruppe für Proteindynamik untersucht die Struktur und Dynamik von Proteinen in Beziehung zur biologischen Funktion. Darüber hinaus entwickelt sie Methoden der Proteinstrukturanalyse. Dazu gehören insbesondere Verfahren zur Nutzung anomaler Röntgenbeugung sowie zur Auswertung und Interpretation diffuser Streuung von Proteinkristallen.

Verfahren der Kristallstrukturanalyse wurden zur de-novo-Bestimmung einer Reihe wichtiger Proteinstrukturen eingesetzt. Alle Röntgenbeugungsmessungen wurden an der Beamline BW6 an DORIS durchgeführt, die von MPG und GBF gemeinsam betrieben wird. Ein Beispiel dieser kollaborativen Arbeiten stellt die Aufklärung der Struktur des Enzyms Furin der Maus dar (Henrich et al., 2003). Furin gehört zur eukaryontischen Subtilisinfamilie der Proprotein-Konvertasen, die viele Sekretproteine und Peptidhormone aus größeren Vorläufermolekülen ausschneiden und aktivieren. Furin ist etwa an der Embryogenese, aber auch an einer Reihe pathologischer Prozesse beteiligt. Es ist u.a. ein Schlüsselenzym der Aktivierung von Glykoproteinen vieler lipidumhüllter pathogener Viren. Die Beugungsmessungen und die Lösung der Kristallstruktur von Furin wurde durch die große Länge einer Achse ( $c = 473 \text{ \AA}$ ) der hexagonalen Kristallform kompliziert. Durch Einsatz eines  $T_6Br_{12}^{2+}$ -Clusters als anomaler Referenzstreuer gelang es, in einem ersten Schritt MAD-Phasen bis zu einer Auflösung von  $4 \text{ \AA}$  zu bestimmen. Die Phasen konnten anschließend bis  $2.7 \text{ \AA}$  erweitert werden. Abbildung 69 zeigt die Kristallstruktur. Sie bildet nun den Ausgangspunkt für eine gezielte Suche nach Substratanalogen zur Hemmung von Furin und damit für die Entwicklung potentieller Therapeutika. Ein weiteres Beispiel einer Anwendung, die sowohl für die biologische Grundlagenforschung als auch für mögliche medizinische Anwendungen von erheblicher Bedeutung ist, stellt die Aufklärung der Reifung und Regulierung des 20S-Proteasoms, des katalytischen Kernbereichs eines multifunktionalen Proteasekomplexes, dar. In Fortsetzung früherer Arbeiten an BW6, die zur Bestimmung der dreidimensionalen Strukturen der 20S-Proteasomen von Archaeobakterien und Hefe führten, wurde nun mit einer archaeobakteriellen  $\beta\text{Thr1Gly}$ -Mutante ein spätes Intermediat des Reifungsprozesses des Multiproteinkomplexes identifiziert und seine Kristallstruktur aufge-

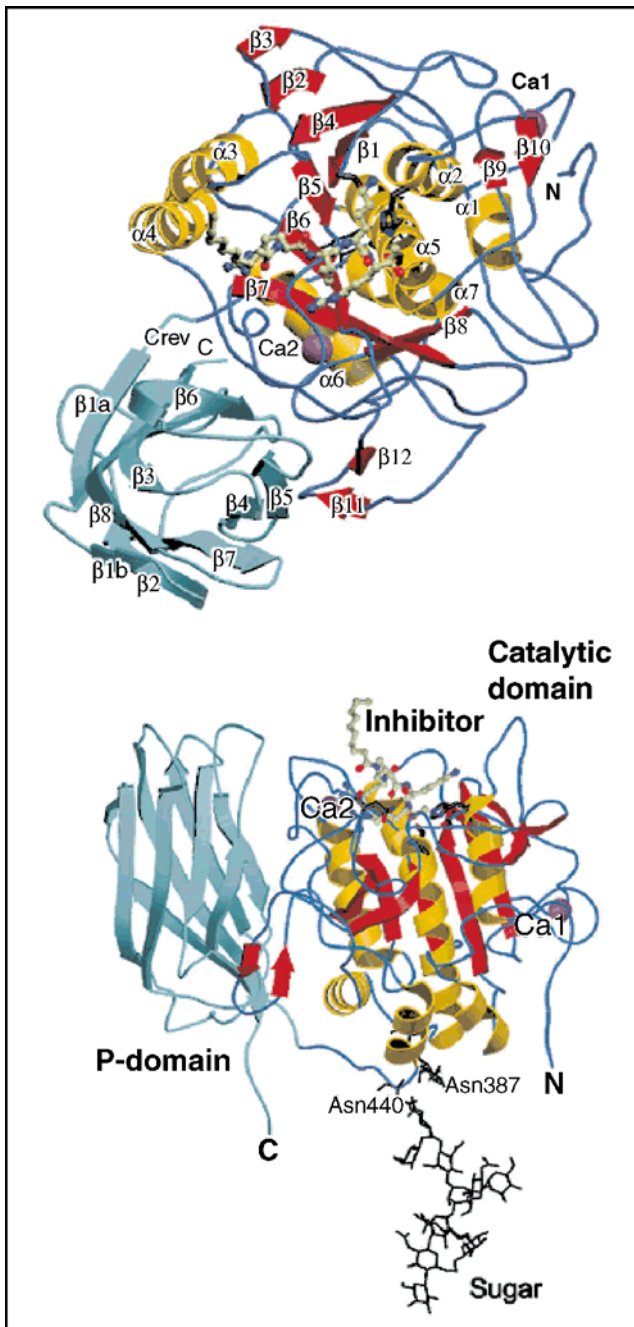


Abbildung 69: Kristallstruktur des Enzyms Furin der Maus in zwei alternativen Orientierungen (Henrich et al. (2003), *Nature Struct. Biol.* **10**, 520-6).

klärt (Groll et al., 2003). Der Vergleich zum Wildtyp zeigt in der Intermediatstruktur einen Verlust struktureller Ordnung an der  $\beta$ - $\beta$ -Trennfläche und lediglich lose assoziierte Proteasomhälften (Abb. 70). Zur Bil-

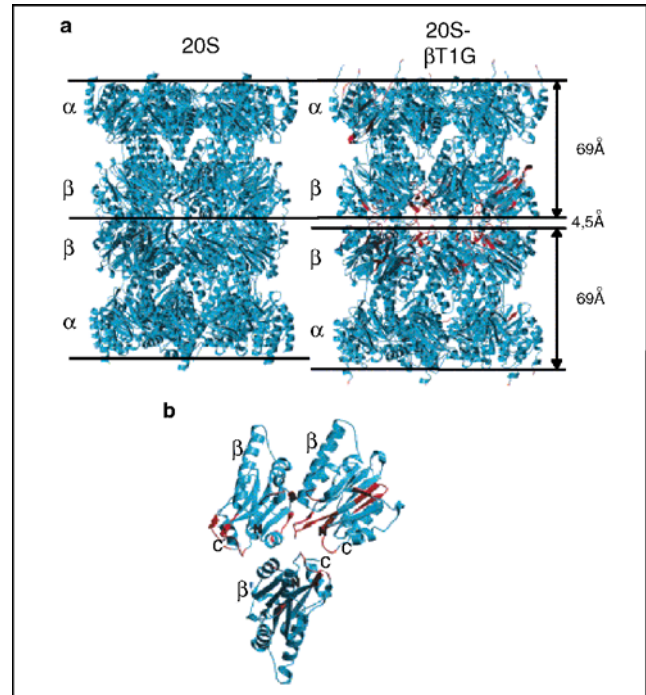


Abbildung 70: (a) Kristallstrukturen des Wildtyps (20S) und der  $\beta$ Thr1Gly-Mutante (20S- $\beta$ T1G) des 20S-Proteasoms von *A. fulgidus*. Im Mutanten sind die beiden Proteasomhälften durch eine Lücke von 4,5 Å getrennt. (b) Die  $\beta$ - $\beta$ -Grenzfläche von 20S- $\beta$ T1G weist keine strukturelle Ordnung auf (Groll et al. (2003), *J. Mol. Biol.* **327**, 75-83).

dung des reifen 20S-Proteasoms ist ein autokatalytischer Prozess als weiterer und letzter Schritt erforderlich.

Ein neuer weiterer Schwerpunkt der Forschung und Entwicklung wurde durch die Beteiligung an dem nationalen X-MTB-Konsortium gebildet. Ziel ist die Aufklärung der Kristallstruktur von Proteinen von *Mycobacterium tuberculosis* sowie die Untersuchung von Komplexen mit Liganden als Grundlage für eine gezielte Suche nach Wirkstoffen.

## Zytoskelett

Mikrotubuli sind Proteinfasern, die zusammen mit anderen Komponenten das innere Gerüst der Zellen, das „Zytoskelett“, bilden. Sie sind für die äußere Gestalt und für die innere Organisation der Zellen verant-

wortlich. Die MPG-Arbeitsgruppe „Zytoskelett“ befasst sich mit der Untersuchung der Mikrotubuli und der damit assoziierten Proteine. Mikrotubuli sind dynamische Strukturen und unterliegen einer strengen Regulation. Andererseits dienen Mikrotubuli vielen zellulären Bewegungsprozessen als Transportschienen und nehmen daher selbst wiederum Einfluss auf die Dynamik der Zelle. Die Motorproteine Kinesin und Dynein sind die aktiven Elemente, die die Bewegung der zu transportierenden Zellbestandteile entlang der Mikrotubuli bewerkstelligen. Fehlfunktionen bei der Regulierung weiterer Mikrotubuli-assoziiierter Proteine können zu krankhaften Veränderungen führen. Im Falle der Alzheimer-Krankheit zum Beispiel kommt es zu einer Aggregation des Proteins Tau, das an der Regulation des Transports durch Kinesin beteiligt ist.

Kinesin besteht aus zwei schweren und zwei leichten Peptidketten. Die leichten Ketten sind für die spezifische Bindung des Kinesin an die zu transportierenden Objekte verantwortlich. Jede der beiden schweren Ketten hat eine etwa 350 Aminosäuren umfassende globuläre Motordomäne („Kopf“), welche an die Oberfläche der Mikrotubuli binden kann und für die Umwandlung von chemischer Energie in gerichtete Bewegung verantwortlich ist. Das so genannte konventionelle Kinesin bewegt sich in Schritten von 8 nm. Das entspricht dem Abstand benachbarter Mikrotubuli-Untereinheiten. Ein einzelnes Kinesin-Molekül, das aus zwei schweren Ketten besteht und daher zwei Köpfe besitzt, kann mehrere hundert Schritte laufen, ohne sich vom Mikrotubulus zu lösen. Eine solche Bewegung erfordert, dass das Molekül zu jedem Zeitpunkt mit mindestens einem Kopf am Mikrotubulus gebunden ist. Das setzt eine strikte Koordinierung der chemomechanischen Prozesse in beiden Motordomänen voraus. Diese Koordinierung erfolgt vermutlich über den gemeinsamen „Hals“, der von helikalen Abschnitten an den Enden der beiden Köpfe gebildet wird und der zur Dimerisierung der Motordomänen führt.

Mittlerweile sind etwa 20 Strukturen von Motordomänen verschiedener Kinesine bekannt, unter anderem von menschlichem Kinesin sowie von nicht-konventionellen Kinesinen aus verschiedenen Organismen. Es gibt jedoch zur Zeit nur eine einzige Struktur eines konventionellen Kinesin im dimerisierten Zustand. Um die Interaktion der beiden Köpfe von konventionellem Kinesin zu untersuchen, wurden in der Arbeitsgruppe

Zytoskelett verschiedenen Konstrukte des schnellen konventionellen Pilzkinesin (*Neurospora crassa*) hergestellt, darunter auch solche mit Hals-Region, die Dimere bilden können. Zwei der Konstrukte wurden kristallisiert und durch Röntgenmessungen an Beamline X13 charakterisiert.

Neben den Motorproteinen gibt es eine Reihe anderer Proteine, die an der Oberfläche der Mikrotubuli binden und daher als "Mikrotubuli-assoziierte Proteine" oder kurz „MAPs“ bezeichnet werden. Eines dieser MAPs ist das Tau-Protein. Durch die Beobachtung der Bewegung einzelner Kinesin-Moleküle mit und ohne Tau konnte nachgewiesen werden, dass Tau nicht nur die Mikrotubuli stabilisiert, sondern auch die Wechselwirkung von Kinesin mit Mikrotubuli beeinträchtigt und damit direkt Einfluss auf den Transport von Vesikeln und anderen Zellorganellen entlang der Mikrotubuli nimmt.

## Struktur der Ribosomen

Der genetische Code ist auf den ersten Blick nur eine Abfolge von vier unterschiedlichen Nukleinsäuren. Jeweils drei Nukleinsäuren (ein Codon) kodieren eine Aminosäure. Die Übersetzung des genetischen Codes und die Verknüpfung der einzelnen Aminosäuren zu einer Proteinkette wird durch eine universelle Zellorganelle, das Ribosom geleistet – und zwar in atemberaubender Geschwindigkeit und einer sehr geringen Fehlerrate. Dieser Prozess der Proteinbiosynthese ist außerordentlich komplex und erfordert eine Vielzahl verschiedener Co-Faktoren, die einzelne Schritte der Proteinsynthese regulieren.

Das Ribosom besteht aus zwei verschiedenen ribosomalen Untereinheiten, die jeweils verschiedene Funktionen im Rahmen der Protein-Biosynthese erfüllen. Die kleine Untereinheit (30S in Prokaryonten bestehend aus der 16S rRNA und 20 ribosomalen Proteinen) ist für die Interpretation des genetischen Codes, dessen Blaupause auf der mRNA abgelegt ist, verantwortlich. Die große Untereinheit, (50S in Prokaryonten bestehend aus 5S rRNA, 23S rRNA und 33 ribosomalen Proteinen) fügt die einzelnen Aminosäuren zu einer langen Peptid-Kette entsprechend des Bauplanes zusammen. Aufgrund der zentralen Rolle des Ribosoms

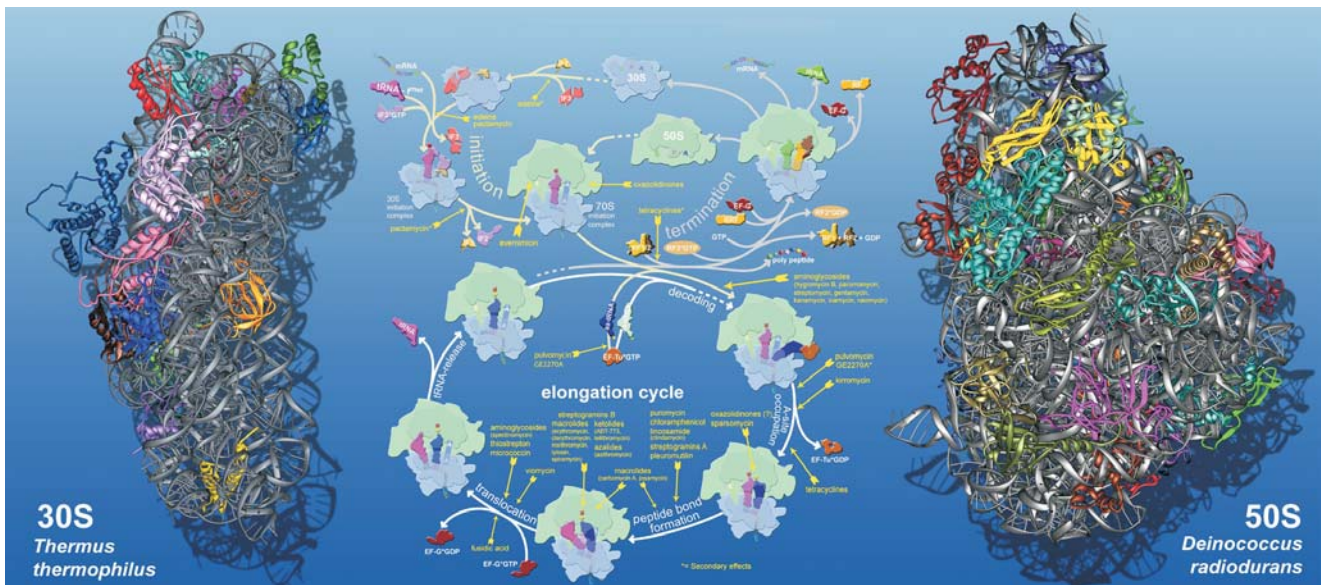


Abbildung 71: Überblick über die verschiedenen Schritte der Proteinsynthese, der beteiligten ribosomalen Untereinheiten und Co-Faktoren, sowie der Angriffsziele der Antibiotika.

in der Protein-Biosynthese ist das Ribosom zugleich das primäre Target vieler Antibiotika.

Basierend auf den strukturellen Untersuchungen der 50S ribosomalen Untereinheit von *Deinococcus radiodurans* konnten in den vergangenen Jahren einige wichtige Mechanismen der ribosomalen Protein-Synthese erfolgreich charakterisiert werden. Im Wesentlichen handelt es sich dabei um drei eng miteinander verbundene Themenbereiche: die Katalyse der Peptid-Bindung durch die 50S Untereinheit; Regelmechanismen innerhalb des ribosomalen Tunnels; die Wirkungsweise von Antibiotika, die an der 50S Untereinheit angreifen. Abbildung 71 gibt einen kleinen Überblick über die verschiedenen Schritte der Proteinsynthese, der involvierten ribosomalen Untereinheiten und Co-Faktoren sowie der Angriffsziele der Antibiotika.

## Katalyse der Peptid-Bindung

Dieser primäre Mechanismus des Ribosoms – die Bildung der Peptid-Bindung aufeinander folgender Ami-

nosäuren – erfolgt im Peptidyl-Transferase-Zentrum (PTC) der 50S Untereinheit. Das PTC ist ausschließlich aus 23S rRNA Nukleotiden aufgebaut. Dieser Bereich des Ribosoms ist phylogenetisch konserviert, d. h. dass alle Organismen im Wesentlichen dieselbe Struktur des katalytischen Zentrums aufweisen. Strukturelle Untersuchungen an bakteriellen Ribosomen geben daher nicht nur Aufschluss über die ribosomale Proteinsynthese von Mikroorganismen, sondern lassen sich direkt auf höhere Organismen bis zum menschlichen Ribosom übertragen.

Der Aufbau des PTC ergibt sich direkt aus der 50S Struktur von *Deinococcus radiodurans* (D50S). Der präzise katalytische Mechanismus war jedoch spekulativ, und verschiedene, widersprüchliche Vorschläge über den Ablauf der enzymatischen Reaktion wurden in den vergangenen zwei Jahren publiziert. Um einen besseren Einblick zu erhalten, haben wir Komplexe mit unterschiedlichen PTC Substraten strukturell untersucht. Es hat sich gezeigt, dass die Wahl des Substrates entscheidenden Einfluss auf die Wechselwirkungen mit dem Ribosom haben. Nur solche Substrate, die ausreichend strukturelle Ähnlichkeit mit der tRNA haben, binden in produktiver Art und Weise. So weisen

kleine Substrate eine andere Orientierung im PTC auf als ein volles Acceptor-Stem-Analog (ASM). Basierend auf diesen strukturellen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine aktive Katalyse basierend auf dem Beitrag einer einzelnen 23S rRNA Base nicht möglich ist. Die primäre Funktion der 50S Untereinheit besteht also in der korrekten Positionierung der Substrate in beiden Bindungsstellen (A-site und P-site). Die Bildung der Peptid-Bindung erfolgt demnach – als thermodynamisch günstig – spontan.

Als wesentliches Element erwies sich dabei eine ausgedehnte symmetrische Region innerhalb der 50S Untereinheit, die die beiden tRNA Bindungsstellen in A- und P-site strukturell miteinander verknüpft. Die Bestimmung der Symmetrie war nur anhand der Bindung des ASM möglich, da andere Substrate die Symmetrie nicht erfüllen, was wiederum ein Indiz für die Bedeutung des Aufbaus des Substrates ist. Dies wird auch durch die universelle Konservierung des 3'-Endes aller tRNA Moleküle sowie praktisch aller symmetrischen 23S rRNA Nukleotide reflektiert.

## Regelmechanismen im ribosomalen Tunnel

Es wurde angenommen, dass der ribosomale Tunnel ein statisches Element innerhalb des Ribosoms darstellt, und sich primär durch ein Fehlen spezifischer Wechselwirkung mit dem naszierenden Protein auszeichnet. Dieser Tunnel durchläuft fast die gesamte 50S Untereinheit und schützt das neu erzeugte, naszierende Protein vor vorzeitiger Proteolyse. Neuere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass die Produktion spezifischer Protein-Sequenzen innerhalb des Tunnels reguliert wird. Die Untersuchungen an einem Makrolid-Antibiotikum, Troleandomycin, haben neue Einblicke in den regulativen Charakter des ribosomalen Tunnels erlaubt. Troleandomycin induziert eine Konformationsänderung im phylogenetisch konservierten Bereich des ribosomalen Proteins L22. Diese Konformationsänderung führt zu einer Beschränkung des Durchgangs durch den ribosomalen Tunnel. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Regulierung von Proteinen wie SecM (Secretory Monitoring Protein M) durch genau diesen Mechanismus erfolgt. Aktuelle kristallographische Untersuchungen an ribosomalen Komplexen, die zum einen den

Trigger Factor, zum anderen kurze, innerhalb des ribosomalen Tunnels gebundene Peptid-Ketten enthalten, scheinen diesen Mechanismen zu unterstützen.

## Wirkungsweise verschiedener Antibiotika

Wie erwähnt konnten wir die Strukturen einer Vielzahl verschiedener D50S-Antibiotika Komplexe aufklären, herausragend dabei die Struktur von D50S mit 3 verschiedenen Makroliden, Chloramphenicol und Clindamycin. Die Makrolide binden am Eingang des ribosomalen Tunnels. Da die Makrolide nicht direkt im PTC wirken, kann das Ribosom auch in der Anwesenheit der Makrolide noch eine Anzahl von Peptid-Bindungen erzeugen, also ein Protein-Fragment von 3–7 Aminosäuren erzeugen, bevor die Protein-Biosynthese zum Erliegen kommt. Die Bindungsstellen der Makrolide unterliegen einigen Variationen. Es zeigt sich, dass die hydrophoben Wechselwirkungen die Bindungsstellen bestimmen, die verschiedenen funktionellen Gruppe der Makrolide die präzise Orientierung geben. So sind zum Beispiel Azalide und Ketolide semi-synthetische Varianten des Erythromycin, die wesentliche Modifikationen aufweisen. Das Einfügen von Azo- oder Keto-Gruppen in den Lacton-Ring führt zu einer Veränderung der Kontakte mit dem Ribosom. Obwohl die Position der wichtigsten funktionellen Gruppe, dem Desosamine-Zucker praktisch unverändert bleibt, wird die Konformation und Orientierung der Antibiotika vergleichsweise stark beeinflusst. Im Falle von Azithromycin wurden sogar zwei Bindungsstellen gefunden, was bis zu dem Zeitpunkt aufgrund biochemischer Daten nicht erwartet worden war. Die zweite Bindungsstelle basiert stark auf der Wechselwirkung zwischen den beiden Molekülen induziert durch die Azo-Gruppe.

Die in Zusammenarbeit mit der Firma Enanta untersuchten Makrolide (EP1112, 1304, 1350, 12398) weisen im Vergleich zu anderen Makroliden – mit Ausnahme von Azithromycin – eine Besonderheit auf: es finden sich mehrere Bindungsstellen innerhalb des ribosomalen Tunnels. Dies bestätigt zum einen die unerwarteten Ergebnisse in Bezug auf Azithromycin, ist zum anderen im Einklang mit neueren pharmakokinetischen (Enanta Pharmaceuticals Inc.) und NMR-spektroskopischen (Vertex Pharmaceuticals, Inc.)

Untersuchungen. Auf der Basis der strukturellen Untersuchungen konnten Vorschläge für neue Antibiotika entwickelt werden, deren Realisation zurzeit untersucht wird.

Strukturelle Untersuchungen an Ribosomen aus *Deinococcus radiodurans* und *Haloarcula marismortui* haben inzwischen die Wirkungsweisen praktisch aller Antibiotika, die die 50S Untereinheit angreifen, aufgeklärt. Die neueste dieser Untersuchungen befasst sich mit der einzigartigen synergistischen Wirkung der Streptogramine. Streptogramine bestehen genau genommen aus zwei chemisch nicht verwandten Komponenten, die üblicherweise als Streptogramin A und B bezeichnet werden. Beide Komponenten werden von *Streptomyces* Bakterien produziert. So wurde Pristinamycin bereits vor rund 40 Jahren als Stoffwechselprodukt von *pristiniae spiralis* isoliert. Die Besonderheit der Streptogramine, bisweilen auch als Synergimycine bezeichnet, ist ihre synergistische Wirkung: die beiden Komponenten können wechselseitig ihre Wirkung potenzieren, und sind dadurch sogar in der Lage, weitgehend resistente Erreger zu eliminieren. Die potentesten Vertreter der Streptogramine sind Dalfopristin und Quinupristin, halbsynthetische Derivate der Pristinamycine. In einer 30:70-Mischung stehen sie seit einigen Jahren unter dem Handelsnamen Synercid® zur Verfügung. Aufgrund der synergistischen Wirkung durchbricht Synercid® die zunehmende Resistenz von *Enterococcus faecium* gegen das Reserveantibiotikum Vancomycin. Ebenso ist es indiziert bei schweren Staphylokokken-Infektionen (einschließlich Methicillin-Resistenz).

Bemerkenswert ist zunächst, dass es eine enge Wechselwirkung zwischen den beiden Molekülen gibt. Diese Wechselwirkung ist primär für die synergistische Wirkung der Antibiotika verantwortlich, denn um beide Antibiotika gleichzeitig an die 50S Untereinheit zu binden, muss eine rRNA Base (A2045) eine ganz spezifische Konformation einnehmen. Da beide Moleküle von dieser vergleichsweise kleinen Änderung der rRNA Struktur profitieren, erhöhen sie auch wechselseitig ihre Affinität. Die Aktivitäten der beiden Moleküle ergänzen sich aber auch in ihren Angriffspunkten. Quinupristin (die Streptogramin B Komponente) bindet in ähnlicher

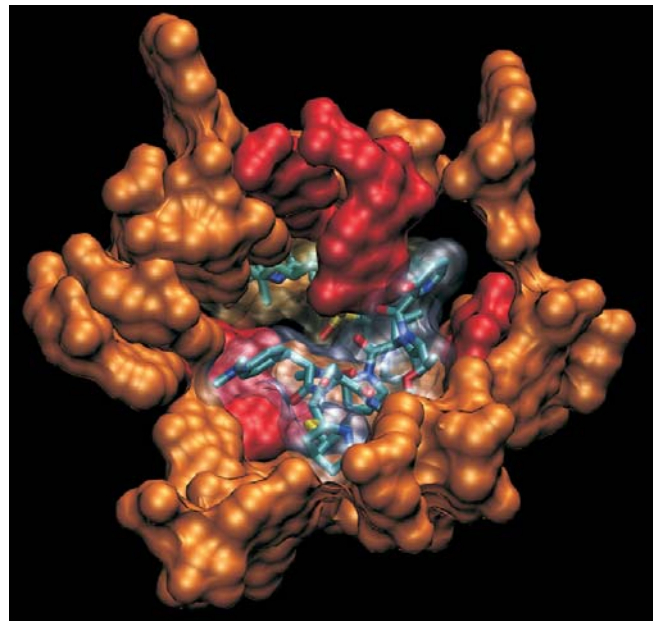


Abbildung 72: Streptogramine (in transparenter Hülle) in ihrer lokalen Bindungstasche (RNA in gold und rot).

Weise wie die Makrolide Antibiotika im Tunnel der 50S Untereinheit, so dass ein Ribosom nur sehr kurze Polypeptidketten erzeugen könnte. Dalfopristin (die Streptogramin A Komponente) verhindert sogar dieses, denn es bindet direkt im Peptidyl-Transferase-Zentrum, so dass tRNA-Moleküle, die die Aminosäuren anliefern, nicht produktiv binden können. Von besonderer Bedeutung ist aber eine andere Änderung der rRNA Struktur, die in erster Linie von Dalfopristin verursacht wird. Eine rRNA Base (U2585) wird unter der Wirkung der Antibiotika um 180 Grad geklappt. Es ist gerade diese Base, die für die Aktivität des Ribosoms in der Bildung der Peptidkette von herausragender Bedeutung ist. Durch die induzierte Änderung, kann die Base nicht mehr aktiv am Geschehen Teil nehmen, und hinterlässt ein inaktives Ribosom. Die Inaktivierung des Ribosoms ist sogar dann noch von Dauer, wenn das Streptogramin A schon nicht mehr gebunden ist. Abbildung 72 zeigt die beiden Streptogramine in ihrer lokalen Bindungstasche.